

ENZYME SENSOR

Publication number: JP62144062

Publication date: 1987-06-27

Inventor: KARUBE MASAO; KUBO IZUMI

Applicant: FUJI ELECTRIC CO LTD

Classification:

- International: G01N27/414; G01N27/30; G01N27/403; G01N27/30;
(IPC1-7): G01N27/30

- European:

Application number: JP19850285308 19851218

Priority number(s): JP19850285308 19851218

[Report a data error here](#)

Abstract of JP62144062

PURPOSE:To suppress the permeation of cation other than ammonia without use of a reference electrode, by providing an ammonia selectively permeating film between an si3N4 film covered with an ion sensitive FET and an enzyme immobilized membrane. CONSTITUTION:A hydrophobic Si3N4 protective film 8 is formed on an SiO₂ film 7 covering a gate section 6 of an ion sensitive FET10. A sample aqueous solution immersed portion of the film 8 is provided with an ammonia selectively permeating film 20 comprising a polymer such as poly-gamma-trichloro ethyl glutamate and an non-actin having ammonia selective permeating property. An enzyme immmobilized membrane 30 is applied covering the film 20. With such an arrangement, H<+>, Na<+>, K<+> and the like in the sample aqueous solution is suppressed in the permeation with the membrane 20 and ammonia which was generated from an enzyme reaction with the membrane 30 premeates selectively to change the gate potential. This can eliminate any reference electrode thereby simplyfying the equipment.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

② 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭62-144062

③ Int. Cl.
G 01 N 27/30

識別記号

厅内整理番号
J-7363-2G
E-7363-2G

④ 公開 昭和62年(1987)6月27日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑤ 発明の名称 酸素センサー

⑥ 特願 昭60-285308

⑦ 出願 昭60(1985)12月18日

⑧ 発明者 脊 部 征 夫 立川市富士見町4-11-8

⑨ 発明者 久 保 い づ み 川崎市川崎区田辺新田1番1号 富士電線株式会社内

⑩ 出願人 富士電線株式会社 川崎市川崎区田辺新田1番1号

⑪ 代理人 斎 理 士 山 口 康

明細書

1. 発明の名称 酸素センサー

2. 特許請求の範囲

1) ポート部を含む第子の裏面部分が吸水性を有する電化粧装保護膜により覆われたイオン感受性電界効果型トランジスタと、このイオン感受性電界効果型トランジスタの空化粧装保護膜の供試水溶液側端部を覆うよう設置されたアンモニア選択透過性膜と、このアンモニア選択透過性膜を覆うよう設置された酸素固定化膜とを備えたことを特徴とする酸素センサー。

2) 特許請求の範囲第1項記載のものにおいて、アンモニア選択透過性膜が膜を形成するポリマーとアンモニア選択透過性膜を有するノナクチソトカラ等をすることを特徴とする酸素センサー。

3) 特許請求の範囲第1項記載のものにおいて、ポリマーがポリ-エーテリクロロエチルグルタメートであることを特徴とする酸素センサー。

3. 発明の詳細な説明

【発明の属する技術分野】

本発明体、イオン感受性電界効果型トランジスタ（以下：ISFETと略称する）を用いた酸素センサー、ことに供試水溶液中の尿素の定量に使用される酸素センサーに関する。

【従来技術とその問題点】

ISFETを信号変換部に利用したバイオセンサーとしては、1980年に了、Jasaita らによって発表されたペニシリンを標識するためのペニシリンセンサーをはじめとして、尿素センサー、グルコースセンサーなどが知られている。これらはいずれもISFETの裏面に形成された分子識別部である酸素固定化膜で有機物が分解されることによって生じるpH変化を、信号変換部であるISFETで電極信号に変換して測定する方式のものであり、センサーを小形かつ高感度化できる利点が得られる。しかしながら、この種のセンサーにおいては供試水溶液中に酵素反応以外の原因でpH、K⁺等のカチオンなどのイオン濃度変化やpHの変化があると、誤差に誤差を生ずるという問題があり、この影響を排除するためにISFET

特開昭62-144062(2)

等からなる参照電極を供試水溶液中に設けて酵素反応以外の原因で生ずる電位変化を検知し、この参照電極の出力信号をISFETの出力信号から差し引くことにより上記誤差要因を算除するなどの対策が必要であり、ISFETを余分に必要とするばかりか両信号を求めるための信号処理回路を必要とするために、装置の複雑化ならびに経済的不利益をもたらす欠点があった。

【発明の目的】

本発明は前述の状況に鑑みてなされたもので、参照電極を用いることなくアンモニア以外のカチオンの影響を検除することができ、したがって供試水溶液中の尿素の測定精度が高く、酵素化されて実用的なセンサーを提供しようとするものである。

【発明の要點】

本発明は、ゲート部を含むFETの表面を酸化錫系(SiO_x)塗膜および塗化錫系(Si_xN_y)保護膜で被覆して防水性を保持したISFETの表面を、線を形成するポリマーとアンモニア選択性膜

能を有する抗生素質ノナクチンからなるアンモニア選択性膜、ならびにこのアンモニア選択性膜の外側に形成された酵素反応の基質または生成物にアンモニアが関与する性質を有する酵素を固定化した酵素固定化膜で二重に被覆するよう構成した。アンモニア選択性膜中のノナクチンは、生体内では生体膜に結合して1種カチオンの透過を選択的に行なうイオノフォアであり、カチオンに対する親和性は $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ で特にアンモニアをよく透過させる。したがって、供試水溶液中の NH_4^+ 、 Na^+ 、 K^+ などのカチオンはアンモニア選択性膜によりその透過が阻害され、これらのカチオンに基づくISFETのゲート電位の変化を阻止するとともに、酵素反応により生じたアンモニアを選択的に透過することにより、供試水溶液中のアンモニア基質、 NH_4^+ によるゲート電位の変化をドレーン電流の變化として容易よく測定することができる。

【発明の実施例】

以下本発明を実施例に基づいて説明する。

第1図は本発明の実施例を示す酵素センサーの剖面図である。図において、10はイオン感度性電界効果型トランジスタ(ISFET)であり、1はP-Si基板、2はソース電極、3はドレイン電極、4はカチオン銀塗膜、5はPチャオルストップ、6は金属電極が形成されたゲート部、7はゲート部6を含むFET表面を覆うよう形成されたSiO_x塗膜、8はSiO_x塗膜の外側に形成された塗化錫系(Si_xN_y)保護膜であり、供試水溶液中に浸漬される部分を塗化錫系保護膜8で覆うことにより、ISFETの防水性を保持することができる。

20はアンモニア選択性膜であり、膜を形成するポリマーと、アンモニア選択性膜を有する抗生素質ノナクチンからなる。ノナクチンは微生物が多く生産しており、四糊から公知の方法で抽出精製して用いることもできるが、ストレプトマイセス・グリセウス社製の市販品を用いてよい。アンモニア選択性膜を形成するポリマーとしては、該ポリマーから形成される膜がプロトンを

透過させず、かつノナクチンの良溶媒であるチトラキドコフラン(THF)に易溶である必要がある。このような条件を満たすポリマーとしてポリメチルグルタノート樹脂体、ポリ塗化ビニリデン、アセチルセルローズ及びその誘導体などがある。これらのポリマーとノナクチンを有機溶媒に溶解させてポリマードープを得、このポリマードープから薄膜を形成させる。ISFETの表面に薄膜を形成するには、ディップコーティング法による。ISFETはポリマーとの接着性を良くするために適当な表面処理を施して用いてよい。処理の有無にかかわらず、ISFETを適度な濃度のポリマードープに浸漬し、引き上げた後適当な方法で乾燥させて薄膜を形成させる。この際、ISFETのゲート部分だけでなく、使用時に供試水溶液に挿入される部分が完全に被覆されるようにアンモニア選択性膜20を形成させる。

30は、アンモニア選択性膜20の上に形成された酵素固定化膜であり、固定化する酵素は、酵素反応の基質または生成物にアンモニアが関与す

特開昭62-144062 (3)

るものであればセンサーとして有効である。このような酵素としては、例えばウレアーゼ、クレアチニンディキナーゼ、グルタミン酸オキシダーゼなどがある。酵素の固定化は公知の方法でかつ簡便を想起できる方法であればどのような方法でもよい。例えは、ポリビニルアルコールやK-カカギーナン、アガロースゲルなどによる包埋固定化法、アルブミン、キトサンなどを担体とする担体架橋法、またはこれらの複合体により、酵素を固定化できる。酵素固定化膜30でISPE-T10のゲート部6を含む先端部を部分的または全体的に被覆することによって、酵素センサーが得られる。

実施例1

CVD後により空化酵素保護膜8が形成されたISPE-T10の表面を、マークノプロピルトリエトキシラン (マークPTES) を80℃、0.5時間の条件下で2時間蒸煮し、100℃2分間加熱処理する表面処理を行なった後、ポリマー-メチル-レ-グルタメートの誘導体であるポリマー-トリクロロエチルグルタメートをポリマーとするア

することにより、第1図に示すような尿素測定用の酵素センサーを得た。

第2図は前述の実施例になる酵素センサーの尿素に対する応答特性線図であり、図中横軸は尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)を含む試料液を30℃に保たれた酵素センサー容器に注入する前の時間を、縦軸はISPE-Tのドレーン電流の変化をゲート部6のゲート電位に換算して示したものである。図において、試料液注入時点 ($t = 0$) 以前における電位 V_g はISPE-T10の空化酵素保護膜8とアンモニア選択透過性膜20との界面における電気二重層に近づく界隈電位であり、尿素を含む試料液が注入され、酵素固定化膜30による酵素反応によって尿素が分解されてアンモニア蒸 (NH_3) が発生する。発生したアンモニア蒸はアンモニア選択透過性膜20を透過して空化酵素保護膜8との界面に到達し、界面電位 V_g を変化させることにより、第2図に示すようにゲート電位が立ち上がり、約2分後には試料液中の尿素濃度に相当した定常状態に到達する。したがって尿素濃度の異なる試料液を用

ンモニア選択透過性膜20を形成した。ポリマー-トリクロロエチルグルタメートは、ポリマー-メチル-レ-グルタメートのメチル基をクロロ-トリクロロエタノールでエスチル交換し、交換率70%となったものを用いた。該ポリマー-100mg及びストレアトマイセス・グリセウス社製のノナクチン2mlをテトラヒドロフラン (THF) 1mlに溶解してポリマードープを得た。上記の方法でマークPTES処理したISPE-Tをこのポリマードープに浸漬した後、ゆっくりと引き上げてディンプレし、10mg/cm²の圧力下、室温で乾燥し、アンモニア選択透過性膜20を形成した。また酵素固定化膜30としては、牛血清アルブミン15mg及びウレアーゼ10mgを0.01M、pH7.0のリン酸緩衝液1mlに溶解させ、グルタルアルデヒド (GA) を1%になるよう拡散して固定した後、ただちにアンモニア選択透過性膜20が形成されたISPE-Tをこの液にディップコーティングし、デシケーター中、5℃で乾燥させるという方法で形成され、さらに0.01M、pH7.0の緩衝液中で十分換水

いてゲート電位あるいはドレーン電流との相関性をあらかじめ校正しておけば、試料液中の尿素濃度を定量的に測定することができる。

また試料液中にH⁺、Na⁺、K⁺等のカチオンが存在した場合、これらのカチオンはアンモニア選択透過性膜20によりISPE-T10の空化酵素保護膜8の界面に近づくことが阻止されるので、ゲート電位に変化を与えることはなく、したがって参照電極を用いることなくアンモニア以外のカチオンの影響を排除できる尿素測定用酵素センサーを得ることができる。

実施例2

マークPTESによる表面処理を施したISPE-Tの表面に前述の実施例と同様な構成のポリマードープを用いて2回のディップコーティングを行なってアンモニア選択透過性膜を形成し、これにエチレンジアミン0.1mlを80℃で蒸着し、さらにグルタルアルデヒド (GA) 0.1mlを80℃で蒸着した。次に、ウレアーゼ20mg、牛血清アルブミン20mgを1mlのpH7.0、0.01Mリン酸緩衝液に溶

特開昭62-144062 (4)

解した後、CAを0.5%になるように添加し攪拌した。この後に上記の処理を施したISFETをディップし、5℃で一日乾燥して酵素固定化膜を形成し、これをさらに0.01M Tris-HCl, pH 7.0 の緩衝液で8時間洗浄して、尿素測定用の酵素センサーを得た。このセンサーを用いて尿素の定量を行なったところ、10~200mg/ℓの範囲で尿素を定量することができた。

【発明の効果】

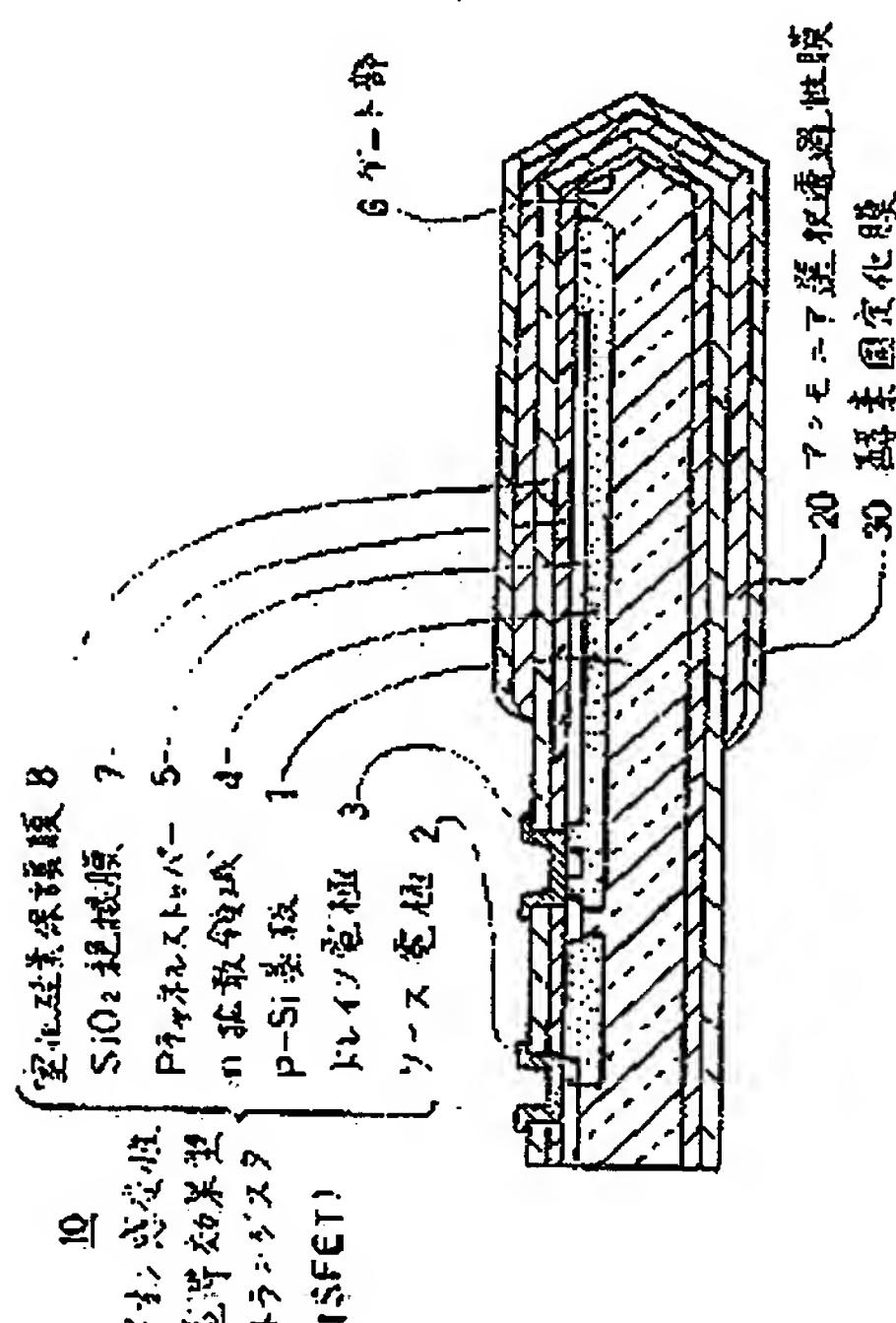
本発明は前述のように、空化硅素保護膜が形成されたISFETでのゲート部を含む表面にアンモニア選択性膜および酵素固定化膜を重層設置して尿素測定用の酵素センサーを構成した。その結果、従来技術で問題となつたアンモニア以外のイオンによってゲート電位が変化することにより規定精度が低下するという問題点がアンモニア選択性膜によって排除され、試料液中の尿素を精度よく定量できる尿素測定用の酵素センサーを提供することができる。また、アンモニア選択性膜によりアンモニア以外のイオンの影響が排

除されたことにより、従来技術において上記イオンの影響を打消すために用いられていた参照電極を省略することが可能となり、かつ参照電極の出力信号をISFETの出力信号から差し引くための信号処理回路が不要となることにより、尿素測定装置を簡素化することができます。判定操作も校正作業が簡単で、尿素の測定精度の高い尿素測定装置を経済的に有利に提供できる利点が得られる。

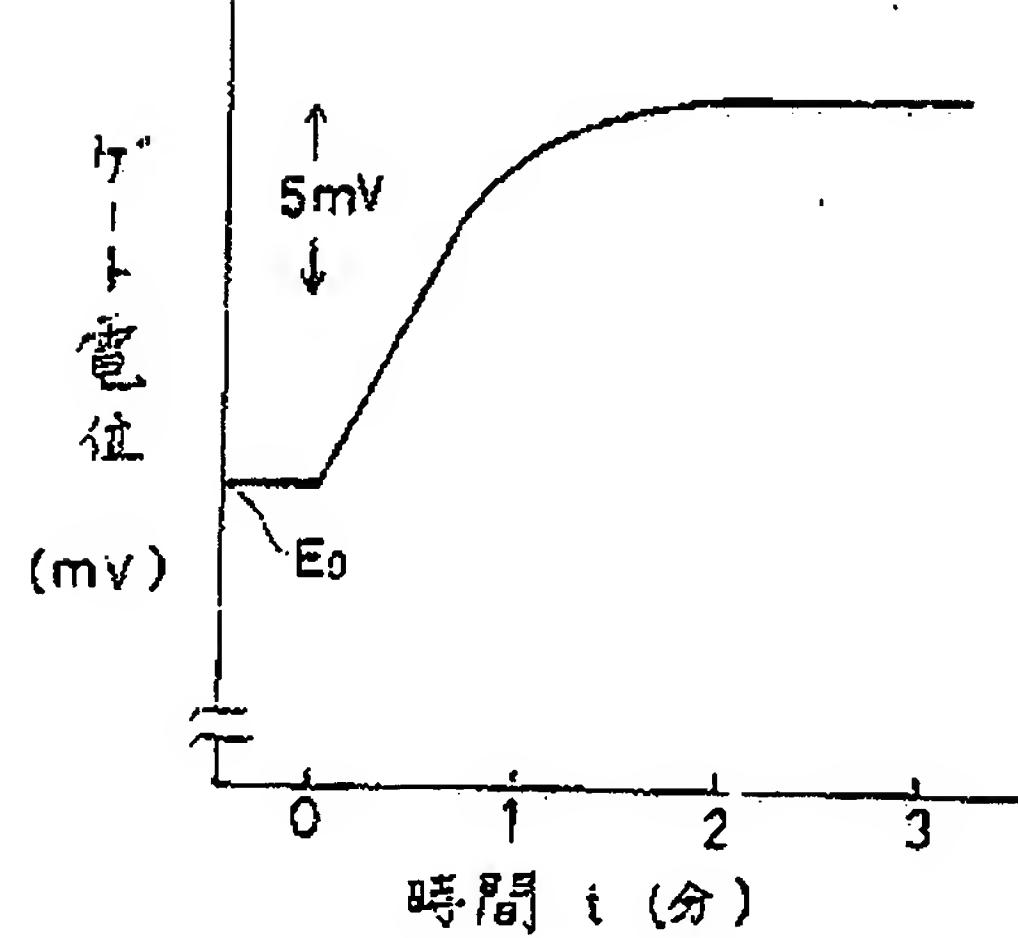
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例を示す酵素センサーの断面図、第2図は実施例におけるセンサーの尿素に対する応答特性線図である。

10: イオン感受性電界効果型トランジスタ (ISFET)、6: ゲート部、7: はSiO₂被覆膜、8: 空化硅素保護膜、20: アンモニア選択性膜、30: 酵素固定化膜。



第1図



第2図